

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN- TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Agronomía

“ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE TUMBO SERRANO (*Passiflora mollissima*(Kunth)L.H. Bailey) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS”

TESIS

Presentada por :

Bach.Jhon Lucio Palacios Calisaya

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TACNA – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela Académico Profesional de Agronomía

Establecimiento in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 30 DE DICIEMBRE DEL 2015,
SIENDO EL JURADO CALIFICADOR :

PRESIDENTE :
MSc. ARISTIDES CHOQUEHUANCA
TINTAYA

MIEMBRO :
DRA. NELLY ARÉVALO SOLSOL

MIEMBRO :
MSc. VIRGILIO SIMÓN VILDOSO GONZALES

ASESOR :
Dr. OSCAR OCTAVIO FERNANDEZ CUTIRE

DEDICATORIA

A mis padres Mary y Wilber, por su apoyo incondicional y por los valores que me inculcaron, por hacerme una persona perseverante y enseñarme a que uno debe de luchar por sus sueños y objetivos.

A mis hermanos Bill, Rodrigo y Fátima quienes me brindaron su apoyo incondicional en todo momento, para lograr obtener en mi Título Profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Jorge Basadre de Grohmann, en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por mi formación Profesional.

Al Ing. M.Sc. Nelly Arévalo Solsol, por su motivación y guía en la realización de este proyecto.

Al Dr. Oscar Fernandez Cutire, por haberme dado la oportunidad de integrar el equipo de profesionales del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y por sus sabios consejos y enseñanzas.

A mis padres Mary y Wilber, por todos aquellos sacrificios que pusieron durante los años de mis estudios.

Finalmente, mi profundo agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera han contribuido en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I : PLANTEAMIENTO Y DEFINICION DEL PROBLEMA	
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Formulación y sistematización del problema	5
1.3 Delimitación de la investigacion.....	6
1.4 Justificación.....	7
1.5 Limitaciones	8
CAPITULO II : OBJETIVOS E HIPOTESIS	
2.1. Objetivos	9
2.1.1. Objetivo general.....	9
2.1.2. Objetivos específicos.....	9
2.2. Hipótesis	10

2.2.1. Hipótesis General.....	10
2.2.2. Hipótesis Específicas.....	10
2.3. Variables	11
2.3.1. Indicadores de Variables	11

CAPÍTULO III : MARCO TEORICO Y CONCEPTUAL

3.1. Antecedentes.	12
3.2. Generalidades	14
3.3. Passiflora mollissima (Kunth) L.H. Bailey.	16
3.4 Cultivo de tejidos.	23
3.5 Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes	44

CAPÍTULO IV : METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

4.1 Tipo de investigación.....	47
4.2 Población y muestra	47
4.3 Materiales y Métodos	47
4.4 Metodología del experimento	48

4.5 Procedimiento experimental53

CAPÍTULO V : RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Contaminación de explantes61

5.2 Supervivencia de explantes.....64

5.3 Altura de brotes por explante.....67

5.4 Número de brotes por explante.73

CONCLUSIONES75

RECOMENDACIONES.....76

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS77

ANEXOS83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Perú producción, superficie cosechada y rendimientos de tumbo según región – 2010	20
Cuadro 2. Combinación de los Factores en estudio	50
Cuadro 3. Porcentaje de contaminación de explantes de (<i>Passiflora mollissima</i>). Tacna 2015	61
Cuadro 4. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de (<i>Passiflora mollissima</i>). Tacna 2015	64
Cuadro 5. Análisis de varianza para altura de brote de explantes (mm) en el establecimiento al sistema in vitro de (<i>Passiflora mollissima</i>). Tacna 2015	67
Cuadro 6. Análisis de varianza para Número de brotes por explantes en el establecimiento al sistema in vitro de (<i>Passiflora mollissima</i> (<i>Kunth</i>) <i>L.H.Bailey</i>). Tacna 2015	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de contaminación de explantes en el sistema in vitro, Tacna 2015	62
Figura 2: Porcentaje de explantes sobrevivientes al sistema in vitro, Tacna 2015	65
Figura 3 : Altura promedio de brotes por explante(mm) , Tacna 2015 .	68
Figura 4: Función lineal de altura de brote por explante (mm) según (bencil aminopurina). Tacna ,2015	69
Figura 5: Línea de proyección para altura de brote por explante (mm) según (bencil aminopurina) .Tacna ,2015	71

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.	Composición del medio de cultivo modificado	83
ANEXO 2.	Composición de componentes orgánicos del medio de cultivo modificado	84
ANEXO 3.	Equipos y Materiales	85
ANEXO 4.	Altura de brote de explante para el establecimiento in vitro de (<i>Passiflora mollissima</i>) a los 40 días (mm)	87
ANEXO 5.	Número de brote de explante para el establecimiento in vitro de (<i>Passiflora mollissima</i>) a los 40 días	88
ANEXO 6.	Descripción y caracterización morfológica de (<i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) H.L. Bailey)	89
ANEXO 7.	Galería fotográfica de actividades realizadas en el establecimiento in vitro de Tumbo	90

RESUMEN

El presente trabajo de investigación que lleva por título “Establecimiento in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth)L.H. Bailey) en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias” , se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias – UNJBG.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el establecimiento apropiado in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) y determinar el nivel fitohormonal apropiado de bencil aminopurina y ácido indolacético.

Los factores en estudio fueron: El factor “A” bencil aminopurina (BAP), constituido por 3 niveles; a1: 0,0 ; a2: 0,5 ; a3:1,0 mg/l ; factor “B” ácido indolacético (AIA), constituido por 4 niveles: b1: 0,0 ; b2: 0,125 ; b3: 0,25 ; b4: 0,375 mg/l. El diseño experimental fue el completamente aleatorio con 10 repeticiones con un arreglo factorial de 3 x 4.

Para la variable contaminación, los resultados mostraron un 4,17% de explantes contaminados y para la variable sobrevivencia fue del 60,0 % de explantes sobrevivientes al sistema in vitro .

Para altura de brote por explante , el análisis estadístico mostró significancia estadística para el Factor “A”, donde el análisis de regresión lineal indicó que a medida que se incrementan los niveles hormonales la altura promedio de brotes tiende a disminuir .

Finalmente para la variable de número de brotes por explantes, los niveles hormonales no influyeron en la formación de brotes .

Palabras clave: explantes, establecimiento in vitro, bencil amino purina, ácido indolacético

ABSTRACT

This research paper is titled "In vitro establishment of serrano tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey) at the Laboratory of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences," developed at the Laboratory of Plant Biotechnology Faculty of Agricultural Sciences - UNJBG.

The objective of this research was to determine the appropriate establishment in vitro of serrano tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey) and in turn determine the appropriate level of Benzyl aminopurine phytohormonal and indoleacetic acid.

The factors studied were: The factor "A" benzyl aminopurine (BAP), consisting of three levels; a1: 0.0; a2: 0.5; a3: 1.0 mg / l; factor "B" indoleacetic acid (IAA), consisting of four levels: b1: 0.0; b2: 0,125; b3: 0.25; b4: 0.375 mg / l. The experimental design was completely random with 10 repetitions. The treatments were a factorial arrangement of 3 x 4.

For pollution variable, the results showed 4.17% of contaminated explants and for the survival variable was 60,0% of survivors explants in vitro system.

For explant height outbreak, statistical analysis showed statistical significance for Factor "A", where the linear regression analysis indicated that as hormone levels increase the average height of outbreaks tends to decrease.

Finally for variable number of shoots per explants, the hormone levels did not influence shoot formation.

Key words: *explants, establishment in vitro, benzyl amino purine, indole acetic acid.*

INTRODUCCIÓN

El mercado internacional de cultivos tropicales, los frutales nativos han empezado a tener una gran demanda por sus propiedades medicinales y curativas: entre dichas especies resalta el tumbo serrano o curuba de monte por sus excelentes propiedades ricas en niacina (3,05 mg), caroteno (0,92 mg) y proteínas (1,20 g)(Calzada ,1993).

A nivel mundial los principales países productores son Colombia, Brasil, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Kenia; entre otros. Los principales mercados para la exportación del tumbo son Estados Unidos y Europa, donde se destina a la elaboración de helados, mermeladas, jaleas, cocktails y yogurt (Copaja , 2004).

A nivel Nacional donde se le considera como especie nativa no tradicional ,existe la presencia de plantaciones en regiones como Ancash, Huancavelica, Junín, La libertad, Loreto, Moquegua, Piura y Tacna

En la región Tacna el cultivo de Tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey) se extiende en los valles interandinos de las Provincias de Tacna, Tarata, Candarave y Jorge Basadre en donde alcanzan

rendimientos de 400 frutos /planta ; las cuáles se encuentran ubicados en andenería o cerca de plantaciones de orégano donde esta especie se ha llegado a adaptar satisfactoriamente (Copaja , 2004).

Sin embargo las poblaciones de dicha especie han ido disminuyendo producto del desinterés de los propios agricultores y la introducción de cultivos con mayor rentabilidad , el cultivo del tumbo no ha sido tomado en cuenta como cultivo de alto potencial productivo y rentable.

Es necesario realizar tareas de manejo y extensión agrícola sobre este cultivo , para poder mejorar la producción y la demanda en el mercado local , regional y nacional , así mejorar la economía de los pequeños agricultores de los valles interandinos de nuestra región y de esta manera elevar su nivel de vida.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el establecimiento apropiado in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) bajo el sistema in vitro.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

La especie de frutal nativo: tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) representa un recurso único y endémico de la serranía de nuestra región, debido a su excelente capacidad de adaptación a las condiciones agroecológicas y medioambientales típicas de nuestra serranía.

Sin embargo las poblaciones de dicha especie han ido disminuyendo producto del desinterés de los propios agricultores y la introducción de cultivos con mayor rentabilidad .

Esto constituye un problema en nuestra región de Tacna ya que se corre el riesgo de perder material biológico único y endémico de nuestros recursos genéticos , propios de los valles interandinos de tacna , Tarata , Candarave y Jorge Basadre.

Las especie de frutal nativos: tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) bajo el sistema actual de cultivo tradicional se enfrentará a serias limitaciones de manejo para generaciones futuras.

Asi es el rendimiento promedio del cultivo , en el primer año la producción es bajo y a partir del segundo año va subiendo su producción hasta llegar al tercer año donde la producción se estabiliza.

Copaja (2004), hizo una descripción agrobotanica del cultivo del tumbo en localidades como : Palca ,Vilavilani ,Tarata ,Ticaco , Cairani , Camilaca , Cambaya y Borogueña lo cuál demostró que el cultivo se encuentra ampliamente distribuido en toda la región .

Según MINAG – OIA 1999, Perú Producción, Superficie cosechada y rendimientos de tumbo según región; hace referencia a la presencia de 2 ha con una producción de 6 toneladas y con un rendimiento de 3000 kg/ha.

Tomando en cuenta que una planta ocupa una extensión de 25 m² esto representa unas 800 plantas aproximadamente distribuidas por toda la región Tacna.

Ante la problemática mencionada urge la necesidad de formular iniciativas eficientes de manejo y propagación.

Con la introducción bajo el sistema de cultivo in vitro de esta especie, y con la optimización del medio de cultivo apropiado, se logrará mantener material in vitro y que será valioso para iniciativas futuras de mejoramiento y propagación.

La situación de esta especie se enfrentará a serios problemas de subsistencia a futuro, ya que sus poblaciones vienen disminuyendo paulatinamente.

1.2 Formulación y sistematización del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuáles serán las condiciones apropiadas para el establecimiento in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) en condiciones de laboratorio?.

1.2.2 Problemas específicos

- a) ¿Cómo influye la aplicación de niveles de la fitohormona 6 – Bencil aminopurina para el establecimiento apropiado in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey). ?

- b) ¿Cómo influye la aplicación de niveles de la fitohormona Acido Indolacético para el establecimiento apropiado in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey). ?

1.3 Delimitación de la investigación

En la presente investigación por ser experimental, se determinará la influencia de niveles de fitohormonales , en el establecimiento in vitro de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey) en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, departamento de Tacna, cuya información corresponde al periodo comprendido desde el mes de Abril a Julio del 2015.

1.4 Justificación

Teniendo en cuenta que el Tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) es fuente importante de sustancias biológicamente activas y representa una fuente de ingresos importante para el sector agrario de las zonas alto andinas, es importante trabajar en aspectos que puedan contribuir a un adecuado manejo de este recurso.

A lo cual urge la necesidad de iniciativas de alternativas eficientes de manejo y propagación; el uso de Tejidos vegetales y el Establecimiento in vitro representa una excelente alternativa.

Se conocen pocos trabajos de propagación in vitro de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) en nuestro país y escasas investigaciones en nuestra región.

La razón del uso del establecimiento in vitro es que con esta técnica se obtienen plántulas clonadas, genotípicamente iguales y más uniformes, similares a las plantas madre de las cuales han sido propagadas.

La investigación tendrá como metas el establecimiento in vitro apropiado de explantes de tumbo con la finalidad de propagar dicho material que será valioso para obtención de material vegetativo saludable e iniciativas futuras de investigación.

Por consiguiente, el presente trabajo pretende profundizar en este aspecto, evaluar un apropiado establecimiento invitro y el efecto hormonal sobre la capacidad morfogénica de explantes de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) y así obtener material vegetativo valioso, el cual servirá para plantear iniciativas de manejo y conservación y así mejorar la economía de los pequeños agricultores de los valles interandinos de nuestra región y de esta manera elevar su calidad de vida.

1.5 Limitaciones

Las limitaciones de la investigación son básicamente: La existencia de una reducida disposición de material vegetativo para toma de muestras y escasa bibliografía en cuanto a estudios bajo el sistema de cultivo in vitro relacionada a la especie en estudio, lo que dificultó el avance con las fechas programadas para su evaluación.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general y específico

2.1.1. Objetivo general

Determinar el establecimiento apropiado in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey).

2.1.2. Objetivos específicos

- a) Determinar el nivel apropiado de la fitohormona 6 – bencil aminopurina para el establecimiento apropiado in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey)

- b) Determinar el nivel apropiado de la fitohormona ácido Indolacético para el establecimiento apropiado in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey).

2.2. Hipótesis general y específica

2.2.1. Hipótesis General.

La aplicación de niveles apropiados de fitohormonas 6 - bencil amino purina y ácido Indolacético tendrán influencia y generarán un establecimiento apropiado in vitro de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey).

2.2.2. Hipótesis Específicas.

- a) Existe un nivel apropiado de la fitohormona 6 - bencil amino purina para el establecimiento in vitro de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey)
- b) Existe un nivel apropiado de la fitohormona ácido indolacético para el establecimiento in vitro de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) .

2.3. Variables

2.3.1. Indicadores de Variables

Variables dependientes (Y)

- Y1 : Contaminacion de explantes.
- Y2 : Sobreviencia de explantes.
- Y3 : Altura de brotes por explantes.
- Y4 : Número de brotes por explantes.

Variables independientes (X)

A: Niveles de 6- bencil aminopurina “BAP”

a₁: 0, 0 mg/l

a₂: 0, 5 mg/l

a₃: 1,0 mg/l

B:Niveles de ácido indolacético “AIA”

b₁: 0, 0 mg/l

b₂: 0,125 mg/l

b₃: 0, 25 mg/l

b₄: 0,375 mg/l

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

3.1. Antecedentes.

Farfán (1983), en su investigación utilizó medios clásicos experimentados como : Murashige & Skoog , Gamborg y 3 hormonas: kinetina, 2,4-D y ANA y tuvo como objetivo determinar los medios nutritivos y actividades de crecimiento óptimos para la obtención de plantas de *Passiflora mollissima*.

Concluyó que para la curuba los medios probados tuvieron un rango hormonal de 0,1 a 1 mg/l de kinetina, en combinación con 2,4-D (0 a 2 mg/l), los mismos que no ofrecieron resultados significativos.

Mosquera et al., (1993), en su investigación para regeneración in vitro de curuba utilizó explantes obtenidos de plantas madre obtenidas de semilla y mantenidas durante 6 meses en invernadero . Los mejores resultados se lograron al emplear 25 ml de medio de cultivo con una relación 7-5 mg/l de 2,4D-BAP, alcanzando un crecimiento promedio de 21,65 veces respecto del tamaño original del nudo. El crecimiento se

estabilizó a los 30 días de incubación, sin presentar rizogénesis ni formación de brotes.

Leal (2003), En su trabajo de regeneración in vitro de *Passiflora mollissima*, realizó diferentes evaluaciones con diferentes concentraciones de citoquininas (BAP – Kinetina) sobre la regeneración de plantas a partir de discos de hoja infectados con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, donde obtuvo brotes iniciales alargados y con presencia de raíces al cultivarlos en un medio Nitsh & Nitsh (1968) sin reguladores de crecimiento ; los cuales fueron posteriormente establecidos en un medio de cultivo Nitsh & Nitsh con 12,5 mg/l de Kanamicina donde se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de 34,9 %.

Becerra (2003), En su trabajo de investigación evidenció el efecto de la edad y el origen del material sobre la capacidad morfogénica de *Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey; utilizando discos foliares en medio Nitsh & Nitsh (1968) suplementado con benzil – aminopurina (BAP 13,3 μ M) y Kinetina (KIN 9,3 μ M), concluyó que a partir de plantas propagadas de 2 y 3 meses de edad se obtuvo mejores promedios para número de brotes (0,44 y 0,74) respectivamente.

3.2. Generalidades

El nombre de Passiflora dado formalmente por L. Pluckenet en 1696, deriva de las palabras latinas “Flor Passionis” flor de la pasión .

Inicialmente, fue la flor la que atrajo la atención tanto de expertos botánicos como de coleccionistas por su gran belleza, sin embargo los frutos poco a poco se fueron consolidando como alimentos muy apetecidos por su valor nutricional y medicinal tanto en Europa como en América del Norte (Escobar, 1991).

3.2.1. Familia Passifloraceae

Comprende mas de 600 especies herbáceas o arbustiva, trepadoras mediante zarcillos caulinares de países tropicales y zonas altas.

Hojas simples, alternas pinnatífidas o pinnatihendidas, compuestas con estipulas pequeñas y caducas (Zegarra, 2008).

Flores solitarias axilares , hermafroditas , raramente unisexuales, actinomorfas, con el tálamo muy desarrollado , cáliz de 5 sépalos , corola con 5 pétalos, a menudo con apéndices que forma una corona , que varia libres o caulescentes; y es la parte más notable de la Familia Passifloraceae , Androceo con 5 estambres , muchas veces con el

ginóforo conformando un androginóforo , que lleva en lo alto el ovario tricarpelar y unilocular .

Fruto: capsula o baya, semilla con testa hueca y arilo carnosos, jugoso. El embrión alargado y recto (Zegarra, 2008).

3.2.2. Género Passiflora

El género Passiflora esta conformado por cerca de 450 especies y 22 subgéneros, según su morfología floral.

Aproximadamente 20 de estas especies son cultivadas como ornamentales por sus atractivas flores, mientras que otras especies como (*Passiflora laurifolia* y *Passiflora foetida*) se utilizan como cultivos de cobertura; otras como *Passiflora foetida* se implementan en el control de malezas y en la prevención de la erosión .

Sólo dos de los subgéneros son cultivados por sus frutos: subgénero Tacsonia, y el subgénero Passiflora. Aunque el género Passiflora es considerado como uno de los más ricos en especies frutales, de 20 a 60 aproximadamente, no obstante, son muy pocas las que comercialmente se cultivan (Heywood, 1985).

3.3. Passiflora mollissima (Kunth) L.H. Bailey.

El tumbo Serrano es un fruto estacional de la sierra peruana que crece entre los 2000 a 3500 m.s.n.m. y que no ha sido industrializado en el país, se consume en forma directa y ocasionalmente como mermelada casera , como fruto tiene escaso valor económico en los mercados pese a su alto contenido de vitamina C (Fernández y Ale, 2005).

El fruto del tumbo tiene un alto valor nutritivo sumamente importante, fundamentalmente se debe al alto contenido de sustancias biológicamente activas como: vitamina C, vitamina A y enzimas diversas (Fernández *et al.*,2005).

3.3.1. Origen y Distribución

El tumbo (*Passiflora mollissima L.*) es una planta perenne , tipo liana, trepadora , alcanza una altura promedio de 10 m ; se le cultiva como cultivo no tradicional , es originaria de los valles serranos de los andes de sudamerica , se le cultiva desde los 2000 a 3500 m.s.n.m. de altitud.

Se cultivan en los países de Venezuela ,Colombia , Ecuador , Perú y Bolivia ; se ha introducido también en Europa y Estados unidos ; en nuestra región se cultiva en los valles interandinos de la provincia de Tacna , Tarata , Candarave y Jorge Basadre (Copaja ,2004).

3.3.2. Taxonomía

Ubicación Taxonómica:

Reino: Vegetal

División: Espermotofita

Sub división: Angiosperma

Clase: Dicotyledoneae

Orden: Violales

Familia: Passifloraceae

Género: *Passiflora*

Especie: *Passiflora mollissima* (Kunth)L.H.Bailey

Nombre común: *Tumbo, Curuba, Tacso.*

(Killip, 1938 y Cronquist, 1978)

3.3.3. Características morfológicas

▪ Sistema Radicular

Esta formado por una raíz principal y raíces laterales que se profundizan hasta 4 metros y sus raíces secundarias se profundizan verticalmente, la cual sirve como anclaje para la planta (Copaja ,2004)

- **Sistema Aéreo**

Tallos

Los tallos son de tipo enredadera, cilíndrico (fácil de trepar y ramifica por ramos secundarios). De color verde oscuro y rojizo cuando los tallos son jóvenes, cuando el tallo principal ya está maduro toma el color café verdoso, luego se ramifica en ramas secundarias (ramosas y muy ramosas) (Copaja, 2004).

Hojas

Las hojas son tribuladas en forma palmeada, lobulada plana, cóncava, las hojas son simples, alternas con la base cordiforme, su borde es aserrado. Las nervaduras presentan la forma palminervia, variando 3 a 5 nervaduras.

Flores

Las flores son grandes y vistosas, hermafroditas, solitarias, axilares. El tubo de la corola de las flores mide de 6 a 10 cm de largo. El color de las flores varía entre rosado claro a rosado oscuro; el tamaño de las flores es de 8 a 13 cm (Copaja, 2004).

Fruto

El fruto del tumbo es una baya; de forma oblonga, ovoide muy alargado. Tenemos frutos pequeños ovoides, también frutos medianos grandes oblongos, suaves de tamaño ovoides de 5 a 7 cm de largo, 3 a 4 cm de ancho y de diámetro 8 - 12 cm de largo y 4 - 6 cm de ancho y de diámetro de 10 – 14 cm; son suaves de color amarillo matizado con manchas rozadas (Fernández *et al.*, 2005).

Las semillas tienen un gran potencial de germinación, por su rusticidad (Copaja , 2004).

▪ Zona de producción

Ancash, Junín, Moquegua y Huancavelica entre los 1,000 a 3,500 m.s.n.m.

En nuestra región se cultivan en los valles interandinos de Tacna, Candarave. Tarata y Jorge Basadre (Copaja , 2004).

CUADRO 01. Perú producción , superficie cosechada y rendimientos de tumbo según región - 1999

Región	Producción (t)	Superficie (ha)	Rendimiento (kg/ha)
Nacional	784	91	57543
Piura	11	5	2200
La libertad	380	24	15833
Ancash	29	5	5800
Lima	6	1	6000
Huancavelica	33	7	4714
Moquegua	37	6	6167
Tacna	6	2	3000
Junín	168	20	8400
Loreto	114	21	5429

Fuente : Dirección Regional sectorial de Agricultura

Elaboracion : MINAG – OIA 1999

3.3.4. Aspectos agrotécnicos

- **Preparación del terreno:** Siembra en hoyos de 0,20 m x 0,20 x y 0,25 m. de profundidad.
- **Época de plantación :** En el mes de Octubre – Noviembre
- **Densidad de plantación:** Se cultiva con ayuda de soportes o tubos formando ramadas. En las ramadas se pueden poner 2,0 m entre plantas y 4,0 m. entre hileras (Minag, 2013).
- **Fertilización:** Dosis de abonamiento 80-60-70 de NPK por ha.
- **Riegos:** Riegos complementarios de 2,000 a 4,000 m³ por hectárea.
- **Labores culturales:** Deshierbos manuales cuando las malezas están pequeñas.
- Cosecha
- **Índice:** Cuando el fruto se torna de un color verde a amarillo.
- **Época:** Con meses de mayor producción de enero a marzo.
- **Post- cosecha:** Temperatura ideal para su almacenamiento de 10° a 12°C.(Minag, 2013).
- **Rendimientos**

El rendimiento del tumbo en nuestra región es uniforme en las localidades de producción, teniendo en cuenta los diferentes ecotipos o

zonas productoras, como promedio de cosecha tenemos 400 frutos por planta.

Se basa en la utilización de abonos orgánicos en 1 ha de cultivo de tumbo. (Copaja, 2004)

Al tercer año de producción

Unidad de medida	:	1 ha
Distanciamiento	:	5 x 5 m.
Área ocupada por planta	:	25 m ²
Densidad de plantas por ha	:	400 plantas de tumbo
Producción por planta anual	:	500 frutos
Peso promedio por fruto	:	95 g
Producción por planta en g/año	:	4 7500 g
Producción por planta kg/ año	:	4 7,50 kg
Producción por ha en kg/ año	:	19 000 kg

Así en el rendimiento promedio del cultivo del tumbo se denota que al primer año la producción es baja y a partir del segundo año va

aumentando su producción hasta llegar el tercer año donde la planta produce mas frutos y llega a un rendimiento de 19 (t / ha) ; teniendo una vida útil estimada en unos 10 años (Copaja, 2004).

3.4 Cultivo de tejidos.

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo in vitro de tejidos vegetales son numerosos y diferentes, Brevemente las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así:

- a) Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines.
- b) Bioconversión y producción de compuestos útiles.
- c) Incremento de la variabilidad genética.
- d) Obtención libres de patógenos.
- e) Propagación de plantas.
- f) Conservación e intercambio de germoplasma.

De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación in vitro, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerá del objetivo perseguido (Roca ,1991).

3.4.1. Factores que afectan los procesos morfogénicos

A. Las condiciones químicas

Varios son los compuestos químicos que influyen en los patrones morfogénicos in vitro dentro de los cuales podemos considerar.

✓ La composición salina del medio de cultivo.

La composición salina más empleada para inducir la organogénesis directa o indirecta en la mayoría de especies vegetales, es la de Murashige & Skoog (1962). Sin embargo existen otras formulaciones diseñadas para inducir determinados patrones morfogénicos. Existe además una estrecha relación entre la composición hormonal del explante y la concentración de reguladores de crecimiento agregada al medio de cultivo (Levitus, *et al.*,2010) .

✓ **Reguladores de crecimiento**

Estos compuesto pueden promover la morfogénesis aun cuando la concentración salina no sea la adecuada . En condiciones óptimas de cultivo pueden aumentar significativamente la diferenciación de órganos. El genotipo y el tipo de concentración de reguladores de crecimiento empleados están estrechamente relacionados.

✓ **Carbón activado**

En general se usa para adsorber compuestos tóxicos de la micro atmosfera gaseosa o el exceso de reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo.

✓ **Agente gelificante**

Un aspecto a tener en cuenta es la consistencia del medio de cultivo, puede emplearse como semi – solido o liquido, el agente gelificante más utilizado en el cultivo in vitro es el agar, extraído de diversas algas marinas.

✓ **Atmósfera gaseosa**

Es un factor determinante en los procesos morfogénicos y esta condicionada por el tipo y tamaño del envase seleccionado para el cultivo, así como también por el sistema de cobertura del mismo. El intercambio gaseoso es diferente para cada tipo de cobertura, en consecuencia la atmosfera interna también sufrirá variaciones.

En condiciones in vivo la atmosfera contiene 78% de nitrógeno, 21% de oxígeno y 0,035 % de dióxido de carbono . En cultivos in vitro se han registrado además, etileno y otros compuestos hidrocarbonados.

El nivel de oxígeno disponible para el explante condiciona en crecimiento y los procesos morfogénicos .En general se necesita una buena aireación para obtener cualquier tipo de proceso morfogénicos

La concentración de dióxido de carbono (CO_2) en la atmosfera gaseosa in vitro varía según la respiración y la actividad fotosintética de las plantas.

En condiciones de oscuridad, el CO₂ incrementa mientras que en condiciones de luz, disminuye.

La presencia de etileno en condiciones in vitro promueven diversas respuestas .Su acumulación tiene efectos inhibitorios sobre el cultivo de células. La cantidad de etileno producida in vitro varia según la especie, el tipo de explante, la concentración de citocininas en el medio de cultivo, el tipo de agar utilizado y con la luz .Una forma de incorporar etileno al envase de cultivo es a través de la esterilización del material de disección realizada con el material sumergido en alcohol y flameado con mechero Bunsen (Levitus, *et al.*,2010).

B. Las condiciones Físicas

Entre las condiciones físicas podemos mencionar los efectos de la temperatura, la humedad relativa y la luz.

✓ La temperatura

Es importante tener en cuenta si bien las condiciones naturales de las plantas experimentan diferencias térmicas durante el día y la noche, las temperaturas in vitro se mantienen casi estables. Es

importante señalar que cuando mas se asemejen las condiciones in vitro a las optimas de crecimiento de la especie utilizada, mayor será la respuesta obtenida.

✓ **La humedad relativa (HR)**

Como medida de la cantidad de vapor de agua contenida en la atmósfera gaseosa, es otro de los parámetros físicos a tener en cuenta. La HR dependerá del sello o cobertura del envase empleado .Si este cierre es hermético, la humedad interior será del 100% .Si en cambio existe la posibilidad de un intercambio gaseoso la humedad interna puede descender a niveles cercanos al 50% .Este importante descenso de la HR puede promover la perdida veloz de agua del medio de cultivo variando la concentración de sus compuestos hasta llegar a niveles tóxicos.

✓ **La luz**

Suministrada a los cultivos debe de ser evaluada en cuanto a la calidad, intensidad y periodo de suministro . La respuesta morfogénica de un explante puede variar según si se le proporciona luz o no.

C. Las condiciones del explante

✓ **El genotipo de explante**

Es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* a la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos.

Por esta causa, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo, así como las condiciones de cultivo seleccionados, deben de ser específicos para cada situación en particular.

✓ **El explante**

Los procesos morfogénicos dependen del genotipo, pero a esto debe sumarse el efecto del explante seleccionado. El tratamiento de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que esta se encuentre y el sector del cual se tome el explante determinaran una vez la respuesta morfogénica en condiciones *in vitro* (Levitus, *et al.*,2010).

- **Edad del explante**

La edad es un factor importante ya que los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad *in vitro* que los adultos.

Los tejidos juveniles presentan una mayor capacidad morfogénica, la cual se manifiesta en respuestas de crecimiento, proliferación y enraizamiento, a diferencia de un tejido maduro el cuál es más difícil de desdiferenciar e inducir a la producción de raíces y brotes.

Por esto razón, los explantes tomados de la parte basal de la planta poseen una mayor capacidad morfogénica (formación de brotes y raíces adventicias) en condiciones *in vitro*, debido a que esta zona presenta el carácter más juvenil.

Tanto la fase juvenil como la fase de madurez en la planta son estables. Esto quiere decir, que si se propaga a partir de material juvenil los brotes obtenidos serán juveniles. Análogamente, si se propaga a partir de explantes provenientes de material adulto, se obtendrán brotes con características adultas (Becerra, 2003).

3.4.2 Etapas de la propagación in vitro

Usualmente el establecimiento in vitro de una planta, de acuerdo a Murashige (1974), se realiza en tres fases (I, II, III), fases a las que Debergh y Maene (1977) adicionan la fase 0 ya la fase III, la subdividen en a y b. Sin embargo, para George y Sherrington (1984) la fase III b la cambian por la fase IV. De esta manera se considera que el establecimiento in vitro de cultivos esta dividida en 5 etapas.

- **ETAPA 0: Selección de material vegetal**

Comprende la selección adecuada del inoculo y el acondicionamiento de la planta madre. Esta fase resulta importante por las características que debe tener la planta que servirá para el establecimiento in vitro (Roca ,1991).

- **ETAPA I: Establecimiento del cultivo**

En esta etapa es condición fundamental emplear tejido fresco y mantenerlo vivo y libre de contaminación (microorganismos) así como considerar tres factores que afectan notablemente los resultados:

- La selección adecuada de los reguladores de crecimiento.
- La fórmula nutrimental se debe ajustar al tipo de inóculo.

- Eliminación del fenómeno de oxidación debido a la presencia de fenoles.

En la fase I, el medio de cultivo debe de permitir que el inculo sobreviva y se establezca para que posteriormente se inicie el proceso de propagación (Gonzales *et al.*, 1999).

- **Etapa II: Multiplicación**

Es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.

- **Etapa III: Enraizamiento**

Corresponde al enraizamiento o etapa de pre trasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del transplante al suelo.

- **Etapa IV: Aclimatación**

Una vez que se tiene un número apropiado de plantas producidas in vitro, se adaptan al ambiente natural (Roca ,1991).

3.4.3 Medios de cultivo

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo in vitro de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no solo sus componentes sino su preparación (Roca ,1991).

- **Fuentes de Carbono.**

Muy pocos cultivos in vitro son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que mas se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa.

La incorporación de myo-inositol al medio (100 mg/l) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de explantes (Roca ,1991).

- **Nutrientes Minerales**

Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras.

El nitrógeno se suministra en forma de nitrato y amonio; aunque los cultivos pueden prosperar con solo nitrato o solo amonio como fuente nitrogenada.

Los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre en concentraciones de 1 a 3 mM. La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante (Na₂EDTA) lo hace disponible en un amplio rango de pH.

- **Vitaminas**

Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general solo sea esencial la incorporación de Tiamina (Roca ,1991).

- **Agente gelificante**

En los medios semi sólidos comúnmente se adiciona agar (0,6 % a 1,0 %). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada (Roca ,1991).

- **Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes que, en pequeñas cantidades, fomentan,

inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal (Lira Saldívar, 1994).

Existen bastante desacuerdo respecto al uso de los términos en el campo de las hormonas vegetales, y mayor confusión ha habido al sintetizarse diversos compuestos de acción hormonal, sean iguales a los naturales, similares o por completo diferentes en su estructura química.

Para evitar confusiones, conviene fijar la terminología de la siguiente manera:

- **Fitorregulador**

Es un compuesto químico capaz de intervenir en el metabolismo, que actúa en muy pequeñas concentraciones para activar o deprimir algún proceso en desarrollo.

Los Fitorreguladores pueden ser naturales, si los produce la propia planta, o sintéticas.

- **Hormona**

Es un fitorregulador natural que tiene acción en un lugar de la planta distinto a donde se produce (Lira Saldívar, 1994).

- **Cofactor**

Es un fitorregulador natural con acción catalítica y regulatoria en el metabolismo, pero cuya acción no es suficiente por si misma para determinar fenómenos de desarrollo, si no actúa de manera de coenzima (Rojas , 1979).

- **Inhibidor**

Es un fitorregulador capaz de deprimir algún aspecto de desarrollo, sea actuando de manera independiente a bien contrarrestando la acción de una hormona. Los inhibidores pueden ser naturales o sintéticos (Rojas , 1979).

Las sustancias reguladores se pueden suministrar como compuestos químicos definidos (Roca, 1991).

A. Auxinas

Es una sustancia orgánica que promueve el crecimiento (aumento en volumen) a lo largo del eje longitudinal en concentraciones apropiadas. Puede decirse que la auxina produce el alargamiento celular, incremento de la respiración y del metabolismo energético (Rojas Garcidueñas, 1979).

▪ Biosíntesis

El término auxina designa cualquier hormona perteneciente al grupo auxínico pero a menudo se usa como sinónimo del Ácido indolacético (IAA) que es la principal auxina natural y que posiblemente se sintetiza a partir del aminoácido triptófano (Estrada , 2000).

La auxina se sintetiza principalmente en el ápice del tallo y ramas jóvenes , en las yemas y hojas jóvenes y en general en los meristemos. El IAA es transportado como IAA – inositol principalmente.

El transporte de las auxinas endógenas es basipétalo por el floema con los productos fotosintetizados. Así , en lugar donde va a actuar se

desliga y pasa a auxina libre que se adhiere a la proteína receptora para efectuar su acción.

- **Accion fundamental**

Se han propuesto varios mecanismos acerca de la acción IAA sobre los ácidos nucleicos. Según uno de ellos actúa removiendo la capa de histonas que envuelve a la cadena de DNA y descubre mensajes que, en su acción, quedarían reprimidos.

Además se agrega que el IAA actúa a nivel de la traducción del mensaje, precisamente sobre el enlace del aminoácido con el ATP que lo activa para unirse al RNA mensajero (enlace acil-adenilato).

Es una característica de las auxinas el que a concentraciones bajas estimulen el metabolismo y desarrollo, y a concentraciones altas lo depriman (Estrada, 2000).

- **Efectos característicos**

En muchos casos las diversas hormonas inducen efectos parecidos y, además, la interacción hormonal dificulta el reconocimiento de efectos típicos para cada hormona (Estrada, 2000).

El principal efecto auxínico es la estimulación del alargamiento celular o su depresión según la concentración del que sea aplicado ; las auxinas , en interacción con otras hormonas , ejercen un efecto característico sobre la diferenciación celular , promoviendo la formación de órganos adventicios. Se dicen que promueven además una dediferenciación celular retornando las celular a una fisiología de meristemo , tomando diversos caminos de rediferenciacion o formando masas de células indiferenciadas , verdaderos tumores que desorganizan la anatomía de los órganos (Estrada, 2000).

Un efecto compartido con otras hormonas es el de activar el transporte de nutrientes por el floema.

Los principales procesos orgánicos que controlan las auxinas son : iniciación de la radícula y de las raíces adventicias , retención de flores y frutos , paso de flor a fruto , juventud del follaje y tropismos.

También se utiliza ampliamente un buen número de sustancia que provocan un efecto fisiológico similar y producidas sintéticamente; son las llamas “auxinas sintéticas “, entre las cuáles el 2,4 – D, el comúnmente (Rojas Garcidueñas, 1979).

Con la adición de auxinas en micropropagación, se busca principalmente estimular el crecimiento y favorecer la formación de raíces. Sin embargo, la respuesta del explante al aplicar auxinas depende del estado fisiológico del material vegetal, la naturaleza de la auxina, tiempo de aplicación y de la superficie de contacto (Rojas , 1993).

B. Citoquininas

▪ Biosíntesis

Las citoquininas se sintetizan principalmente en la raíz , y su presencia en las yemas del tallo, donde tiene efecto hormonal y puede ser transportado desde la raíz pero hay informes de sus síntesis en hojas.

▪ Accion fundamental

Se ha demostrado en cultivo de tejidos que cuando se dan citocininas marcadas estas aparecen en la cadena de RNA a la que se incorporan al llevar adenina en su molecula ; esta incorporación es

muy probable que tenga un efecto en la expresión fisiológica de los genes (Estrada , 2000).

- **Efectos característicos**

Aún cuando todas las hormonas activan la división celular , lo hacen indirectamente como efecto de la activación metabólica; las citocininas son, típicamente las “hormona de la división celular” y activan el proceso directamente . Otro efecto es determinar la dominancia apical ,por la que el crecimiento de la ramas se supedita al del tallo en la velocidad y dirección ; en este fenómeno interaccionan con las auxinas.

Otros efectos como el promover la formación de órganos , la germinación ,etc.,. Probablemente se derivan de los efectos primarios como suceden con otras hormonas , las citocininas activan también el transporte de nutrientes (Estrada , 2000).

Los fenómenos estimulados por las citocininas son característicos de las plantas y tejidos jóvenes ,por lo que parecen ser esencialmente “Factores de juvenilidad” (Rojas , 1979).

A nivel in vitro se ha reportado que la combinación de dos citocininas puede ser más eficiente para la proliferación de brotes ; la aplicación de citocininas puede promover la síntesis de citocininas endógenas. En micropropagación las citocininas son utilizadas principalmente para lograr la producción de tallos múltiples y el desarrollo de yemas laterales, para inducir división y expansión celular (Rojas Garcidueñas, 1979).

C. La relación auxina/citocininas regula la morfogénesis en cultivos de tejidos.

El tipo de morfogénesis que ocurra en un tejido vegetal depende de la concentración y la relación auxinas/citoquininas en el medio de cultivo (Roca ,1991).

Las hormonas no son los únicos factores determinantes de la organogénesis , ya que en algunas especies o variedades ésta ocurre espontáneamente pero en otras hay que inducirla con un manejo experto de fitohormonas en el medio y algunas mas no pasan a desarrollo organizado de ningún modo (Rojas , 1979).

El concepto general establecido por Skoog y Miller (1957) sobre que la diferenciación de las plantas esta regulada por el balance fitohormonas

(auxinas y citoquininas) es aplicable universalmente. De acuerdo a esta hipótesis, la naturaleza de la diferenciación (órganos o embriones) esta determinada por las concentraciones relativas de las fitohormonas.

Se puede decir que el cultivo in vitro es generalmente imposible sin reguladores . Si un medio nutritivo se le debe añadir una auxina o una citoquinina , para conseguir la extensión y/o la división celular , es algo que depende del tipo de explanto y de la especie vegetal.

Por ejemplo , explantes que producen suficiente cantidad de auxina , no necesitan una cantidad adicional para conseguir la extensión y/o la división . Otros explantes producen suficiente cantidad de citoquinina , no precisando de ninguna acción exógena . Se puede hacer la siguiente división , en relación con el crecimiento de células , tejidos , órganos , etc.:

1. Cultivos que no necesitan ni auxinas ni citoquinina.
2. Cultivos que necesitan solo auxina.
3. Cultivos que necesitan solo citocininas.
4. Cultivos que no necesitan auxinas ni citoquinina (Beinities , 2005).

Las necesidades cualitativas y cuantitativas de las plantas por las auxinas y citocininas son variables y por lo tanto para la multiplicación en brotes, la presencia de auxina en el medio básico, no es esencial.

En gran número de casos, la citocininas es suficiente (aparentemente) para inducir la multiplicación de los brotes, pues debemos considerar la concentración de auxinas internas de la planta (Estrada . 2000).

Skoog y Miller (1957) , mostraron que en callo proveniente de la médula de tabaco podía ser inducido a formar raíces o yemas o bien simplemente continuar formando callo dependiendo de las cantidades relativas de dos reguladores de crecimiento (hormonas vegetales), auxina y citoquinina en el medio de cultivo.

- Relación auxina / citoquinina alta = formación de raíces
- Relación citoquinina / auxina alta = formación de yemas caulinares
- Valores intermedios = se mantiene un crecimiento desorganizado (Estrada , 2000).

3.5 Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados in vitro, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes

celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuáles son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Gonzales et al., 1999).

En el caso particular del cultivo de tejidos in vitro, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Azofeifa,2009).

3.5.1 Medias prácticas para el manejo del oscurecimiento de explantes cultivados in vitro.

Para empezar, la prevención y disminución de las circunstancias que provocan o estimulan el estrés oxidativo en el explante es el mejor procedimiento para impedir el desencadenamiento de eventos que conllevan a la oxidación del mismo, se puede recurrir a una serie de medidas prácticas.

A. Reducción del posible daño durante el establecimiento

El problema de oxidación se puede disminuir reduciendo la duración del proceso de escisión y de esterilización del explante o con la sustitución del agente desinfectante.

B. Dispersion de sustancias fenólicas

La presencia de sustancias fenólicas en el medio de cultivo, liberadas por el explante, tiene un efecto auto catalítico. Por lo que la remoción y, o dispersión de las mismas se considera un método de control efectivo.

✓ Otros componentes

Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos y otros.

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L- cisteína, polivinilpirrolidona) .El carbón activado (0,1 % a 5%), incorporado al medio, ha mostrado ser utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos (Azofeifa, 2009).

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación fue experimental.

4.2 Población y muestra

La población se consideró a todos los explantes introducido ; por cada tratamiento se tuvieron 10 repeticiones , de los cuales un tubo representó una unidad experimental , se tomaron 5 muestras por tratamiento es decir 5 tubos de ensayo.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Ubicación del experimento

El experimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, (área frutales) de la Facultad de ciencias Agropecuarias, ubicado en el centro experimental CEA III Los Pichones , de propiedad de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

4.3.2 Material experimental

El material experimental estuvo constituido por:

A. Material vegetal

El material vegetal que se utilizó fueron yemas axilares de una longitud de 2 – 3 cm como explantes primarios, que fueron seleccionados y recolectados de plantas madres de buenas características instaladas en el vivero perteneciente al laboratorio en donde se efectuó la investigación.

Se utilizó el 6 – bencil amino purina y el ácido indolacético, ambos en su forma pura.

4.4 Metodología del experimento

Factores en estudio :

Factor A : 6-bencil aminopurina – Citoquinina, los niveles fueron :

- a_1 : 0,0 mg/l

- a_2 : 0,5 mg/l

- a_3 : 1,0 mg/l

Factor B : ácido indolacético – Auxina, los niveles fueron :

- **b₁** : 0,0 mg/l

- **b₂** : 0,125 mg/l

- **b₃** : 0,5 mg/l

- **b₄** : 0,375 mg/l

Variables de respuesta

Contaminacion de explantes.

Se realizó mediante la observación de la presencia de agentes contaminates en los explantes a los 15 días de la introducción al sistema in vitro.

Sobrevivencia de explantes.

Se realizó mediante la observación de sobrevivencia de explantes a los 15 días de haberse realizado la introducción al sistema in vitro.

Altura de brotes por explantes.

La evaluación de la altura de brote por explante se realizó con la ayuda de un vernier, desde la base del explante hasta el ápice terminal del mismo, a los 40 días de la introducción al sistema in vitro.

Número de brotes por explantes.

La evaluación de número de brotes por explante se realizó mediante conteo directo, a los 40 días de la introducción al sistema in vitro.

Cuadro 2 : Combinacion de los factores en estudio

VARIABLES		Combinación	Tratamientos
Niveles de bencil aminopurina	Niveles de ácido indolacético		
a ₁	b ₁	a ₁ b ₁	T ₁
	b ₂	a ₁ b ₂	T ₂
	b ₃	a ₁ b ₃	T ₃
	b ₄	a ₁ b ₄	T ₄
a ₂	b ₁	a ₂ b ₁	T ₅
	b ₂	a ₂ b ₂	T ₆
	b ₃	a ₂ b ₃	T ₇
	b ₄	a ₂ b ₄	T ₈
a ₃	b ₁	a ₃ b ₁	T ₉
	b ₂	a ₃ b ₂	T ₁₀
	b ₃	a ₃ b ₃	T ₁₁
	b ₄	a ₃ b ₄	T ₁₂

Fuente : Elaboracion Propia

4.4.1 Diseño experimental.

Se utilizó el diseño completamente aleatorio (DCA) con 10 repeticiones y con un arreglo factorial de 3x4 .

- **Análisis estadístico**

Se realizó utilizando la técnica del análisis de varianza , bajo el modelo completamente al azar, siendo el modelo aditivo lineal siguiente :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, a \quad j = 1, \dots, b \quad k = 1, \dots, n$$

donde :

Y_{ijk} = Es el valor de la variable respuesta observada con el *i*-ésimo nivel del Factor A , *j* –ésimo del factor B, *k*-ésima repetición.

μ = Es el efecto de la media general.

α_i = Es el efecto del *i*-ésimo nivel del Factor A.

β_j = Es el efecto del *j*-ésimo nivel del Factor B.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Es el efecto de la interacción en el *i*-ésimo nivel del Factor A, *j*-ésimo nivel del Factor B.

ϵ_{ijk} = Es el efecto del error experimental en el i-ésimo nivel del Factor A, j-ésimo nivel del Factor B.

a = Es el número de niveles del Factor A.

b = Es el número de niveles del Factor B.

k = Es el número de repeticiones en el i - ésimo nivel del Factor A, j-ésimo nivel del Factor B.

La prueba estadística correspondio a la prueba F a un nivel de significación α 0,05 y 0,01 , y análisis de regresión lineal para los niveles del Factor A.

Para la tabulación , los datos fueron transformados antes de realizar el análisis de varianza , utilizando la formula.

$$\sqrt{x}$$

Donde x fue una variable cuantitativa discreta .

4.5 Procedimiento experimental

Preparación de soluciones Hormonales

A.Preparación de la hormona 6- bencil amino purina (BAP)

Solución concentrada de BAP :

- Pesar 0,01 g de BAP y disolver bien con algunas gotas de NaOH1N en un vaso de precipitados de 10 ml.
- Posteriormente agregar lo diluido en una fiola de 100 ml.
- Finalmente agregarlo en un envase estéril debidamente rotulado y conservar a 0°C.
- Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 0,1 mg de BAP.

B.Preparación de la hormona ácido Indolacético (AIA)

Solución concentrada de AIA:

- Pesar 0,01 g de BAP y disolver bien con algunas gotas de NaOH 1N en un vaso de precipitados de 10 ml.
- Posteriormente agregar lo diluido en una fiola de 100 ml.
- Finalmente agregarlo en un envase estéril debidamente rotulado y conservar a 0°C.

- Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 0,1 mg de AIA.

A. Preparación de soluciones stock.

Para el desarrollo de la investigación se procedió a la elaboración de un medio de cultivo modificado , utilizando el medio de cultivo Nitsh&Nitsh (N&N) y Murashige & Skoog (M &S).

A lo cual se prepararon soluciones stock con los respectivos reactivos a utilizar.

Solución stock “A” Medio Nitsh&Nitsh

Pesar los siguientes reactivos:

NH_4NO_3 7,2 g

KNO_3 9,5 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y conservar la solución en un envase debidamente etiquetado a 4°C.

50 ml de la solución contienen los reactivos para un litro de medio de cultivo.

Solución stock “B” Medio Nitsh&Nitsh

Pesar los siguientes reactivos:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,2 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y conservar la solución en un envase debidamente etiquetada a 4°C.

50 ml de la solución contienen los reactivos para un litro de medio de cultivo.

Solución stock “C” Medio Nitsh&Nitsh

los siguientes reactivos:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,85 g

KH_2PO_4 0,68 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y conservar la solución en un envase debidamente etiquetada a 4°C.

50 ml de la solución contienen los reactivos para un litro de medio de cultivo.

Solución stock “D” Medio Nitsh&Nitsh

Pesar los siguientes reactivos:

FeSO₄.7H₂O 0,0278 g

Na₂EDTA 0,373 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y conservar la solución en un envase debidamente etiquetada a 4°C.

50 ml de la solución contienen los reactivos para un litro de medio de cultivo.

Solución stock “E” Medio Murashige & Skoog(MS)

Micro elementos

Pesar los siguientes reactivos:

MnSO₄.H₂O 0,223 g

ZnSO₄.7H₂O 0,086 g

H₃BO₃ 0,062 g

KI 0,0083 g

Na₂MoO₄.2H₂O 0,0025 g

CuSO₄.5H₂O 0,00025 g

CoCl₂.6H₂O 0,00025 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y conservar la solución en un envase debidamente etiquetada a 4°C.

50 ml de la solución contienen los reactivos para un litro de medio de cultivo.

Solución stock “F” Medio Murashige & Skoog(MS)

Vitaminas

Pesar los siguientes reactivos:

Acido nicotínico 0,001 g

Piridoxina HCL- 0,0005 g

Glicina 0,002 g

Tiamina HCL- 0,0001 g

Myo-inositol 0,1 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y conservar la solución en un envase debidamente etiquetada a 4°C.

50 ml de la solución contienen los reactivos para un litro de medio de cultivo.

Preparación de medio de cultivo modificado

Al ser un experimento que consta de diferentes niveles hormonales , se procedió a preparar los mismos de manera individual; cada tratamiento esta constituido de 100 ml de medio de cultivo con su respectiva concentración hormonal.

La composición nutricional del medio de cultivo para cada tratamiento se mantuvo de manera uniforme de la siguiente manera:

Se agregó en un vaso de precipitados lo siguiente:

5 ml de la solución stock "A"; 5 ml de la solución stock "B", 5 ml de la solución stock "C", 5 ml de la solución stock "D", 5 ml de la solución stock "E" ,5 ml de la solución stock "F" ,10 mg de myo-inositol y 20 g de sacarosa por 100 ml de medio de cultivo.

Luego se precedió a agregar los niveles de las fitohormonas respectivos.

Se completó con agua destilada enrazando la solución en una fiola de 100 ml; se le agregó al medio de cultivo carbón activado 8 g/l y medir el pH y ajustar entre 5,6 - 5,8 ; se agregó el agente gelificante Phytigel 2,5 g/l y se le llevó al microondas por 59 segundos a una temperatura de 190 C° hasta que el medio empiece a hervir.

Finalmente se repartió 10 ml del medio de cultivo por cada tubo de ensayo de 25 x150, para luego ser esterilizados en autoclave (121,1 °C, 15 lb.depresión por 20 minutos.

Introducción y Establecimiento in vitro

Este proceso consta de 2 etapas y su éxito depende de que las mismas se desarrollen satisfactoriamente.

A. Desinfección en el invernadero: En esta etapa se recolectaron los brotes de plantas madres ubicadas en los invernaderos del laboratorio. Se realizó un primer lavado de los brotes con agua corriente, posteriormente se diseccionaron los brotes; producto de los cuales se obtuvieron explantes de 2,0 – 3,0 cm, finalmente se hizo un segundo lavado con Jabón líquido antibacterial por 15 minutos para luego ser enjuagados 2 veces con agua destilada.

B. Desinfección en el laboratorio: En esta etapa se realizaron dos procesos de desinfección.

La desinfección inicial de explantes se efectuó en la sala de esterilización, donde los explantes se sumergieron en una solución fungicida (Vitavax -300 (Polvo mojable- WP) 0,85 g/l por 15 minutos, posteriormente se sumergieron los explantes en una solución de

Povidine (1,1g/100 ml de Iodo+8,5g/100 ml de Polivilpirrolidona) 1ml/l por 10 minutos. (Al finalizar cada paso se enjuagó con abundante agua destilada esterilizada).

Seguidamente, los explantes fueron desinfectados en la cámara de flujo laminar; donde se sumergieron en una solución de Hipoclorito de sodio al 30% por 15 minutos para que finalmente ser enjuagados 5 veces con agua destilada estéril.

Previamente se esterilizó la cámara de flujo laminar y los instrumentos de metal (pinzas, bisturís, etc.). Posteriormente se colocaron los explantes en la placa Petri, donde se realizó la disección correspondiente.

Finalmente los explantes desinfectados, fueron introducidos en tubos , los cuales contenían el medio de cultivo antes señalado, ubicando la yema del explante en una posición hacia arriba, finalmente se flameó y tapo el tubo para evitar la contaminación y se selló el tubo con Parafilm; y se procedió a ubicarlo en el cuarto de incubación.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Contaminación de explantes

La evaluación de contaminación de explantes de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey) se realizó a los 15 días de la introducción al sistema in vitro.

Cuadro 3: Porcentaje de contaminación de explantes de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey) Tacna 2015.

Trat	Nº Explantes introducidos	Nº Explantes contaminados	Contaminacion %
a1b1	10	1	10
a1b2	10	3	30
a1b3	10	0	0
a1b4	10	0	0
a2b1	10	0	0
a2b2	10	0	0
a2b3	10	1	10
a2b4	10	0	0
a3b1	10	0	0
a3b2	10	0	0
a3b3	10	0	0
a3b4	10	0	0
Promedio %			4.17

Fuente: Elaboración Propia

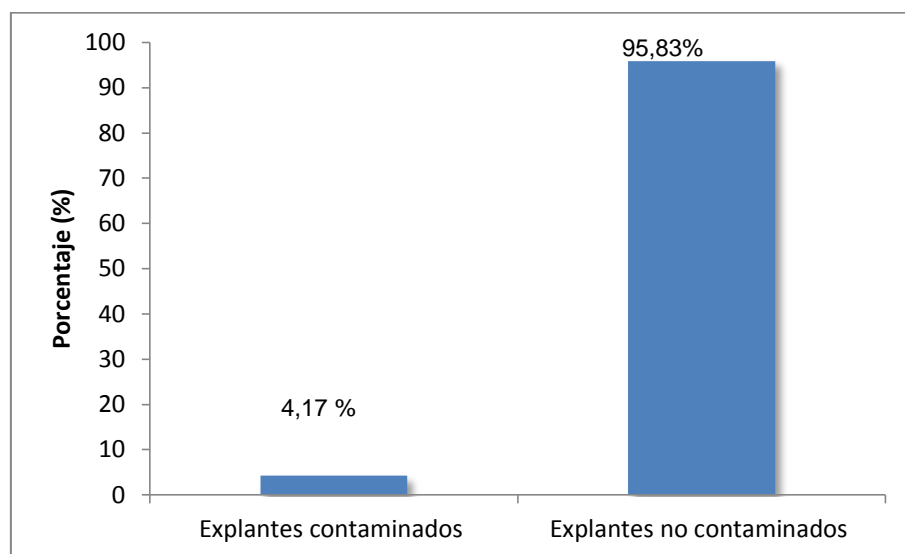


Gráfico 1 : Porcentaje de contaminación de explantes en el sistema in vitro, Tacna 2015.

En el presente trabajo de investigación se obtuvo un promedio de 4,17% de explantes contaminados (**Cuadro 3**) (**grafico 1**), y un 95,83 % de los mismos libres de cualquier tipo de contaminación .

Ramirez et al., (2009), obtuvo 91,3 % de explantes viables, libres de contaminación y sin problemas de ennegrecimiento u oxidación de los tejidos, a los 30 días de cultivo a su vez **Rodriguez et al., (2011)**, estableció para (*Passiflora edulis slim*) un eficiente protocolo de desinfección para secciones nodales y de lámina foliar para plantas juveniles (de 5 meses de edad) provenientes de condiciones semi controladas de invernadero , el cual presenta un 97 % de esterilidad y un

0% de oxidación de inóculos , todos estos trabajos se contrastan con los resultados obtenidos en la presente investigación donde se alcanzó un 95,83 % de explantes libres de contaminación y oxidación.

5.2 Supervivencia de explantes

La evaluaci3n de supervivencia de explantes de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey) se realiz3 a los 40 d1as de la introducci3n al sistema in vitro.

Cuadro 4: Porcentaje de supervivencia de explantes de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey) Tacna 2015.

Trat	Explantes introducidos	Explantes contaminados	Explantes Sin respuesta	Explantes sobrevivientes	Supervivencia %
a1b1	10	1	3	6	60
a1b2	10	3	1	6	60
a1b3	10	0	3	7	70
a1b4	10	0	4	6	60
a2b1	10	0	3	7	70
a2b2	10	0	5	5	50
a2b3	10	1	1	8	80
a2b4	10	0	4	6	60
a3b1	10	0	5	5	50
a3b2	10	0	4	6	60
a3b3	10	0	5	5	50
a3b4	10	5	5	5	50
TOTAL					60.0

Fuente: Elaboraci3n Propia

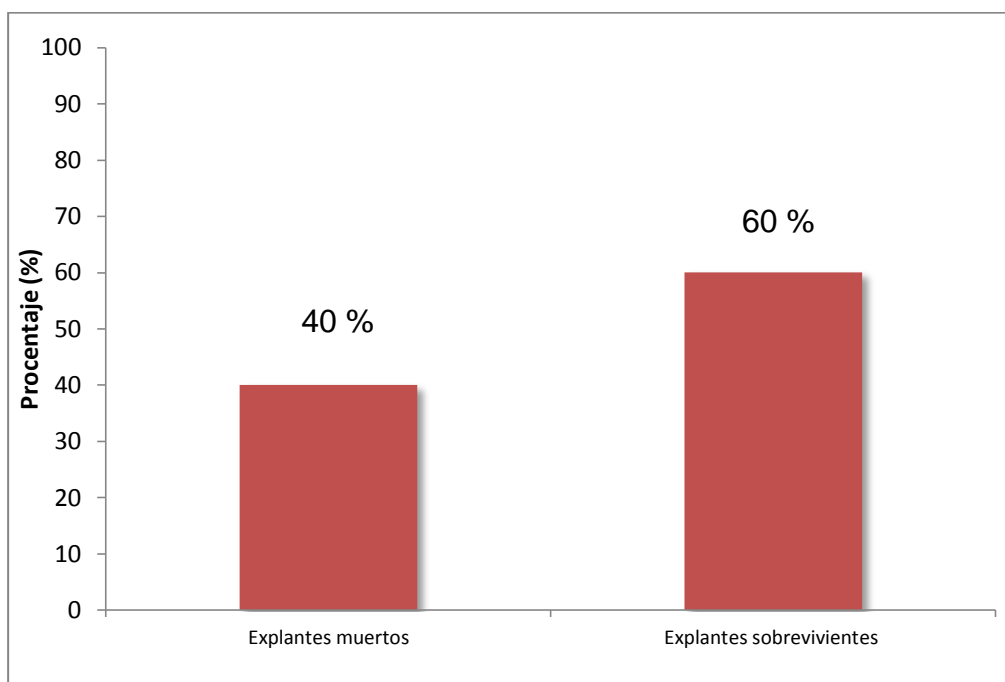


Gráfico 2 :Porcentaje de explantes sobrevivientes al sistema in vitro,Tacna 2015.

Fuente : Elaboracion Propia

En el presente trabajo de investigación se obtuvo el 60,0% de sobrevivencia de explantes (**Cuadro 4**) (**gráfico 2**) , y un 40 % de los mismos muertos .

Otahola et al., (2010) , obtuvo para porcentaje de sobrevivencia de explantes de yemas laterales de parchita (*Passiflora edulis f.flavicarpa*) y parcha granadina (*Passiflora quadrangularis*) bajo diferentes dosis de bencilaminopurina (BAP) evaluados a los 45 días después de la

inoculación , alcanzó como promedio de los tratamientos en estudio un 59,32 % de sobrevivencia de explantes , los cuales se asemejan a los resultados obtenidos en esta investigación y denotan la elección apropiada de la composición del medio de cultivo elegido .

5.3 Altura de brote (mm) de explantes introducidos de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey).

De acuerdo al análisis de varianza para el variable altura de brote (mm) de explantes introducidos al sistema in vitro a 40 días de su introducción , existe diferencia significativa para el Factor “A” (bencil aminopurina).

Cuadro 5: Análisis de varianza para altura de brote por explantes (mm) en el establecimiento al sistema in vitro de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) Tacna 2015.

F.V.	SC	G.L.	CM	FC	FT	
A	298,300	2	149,15	5,5549	3,190	5,08 S *
B	213,383	3	71,13	2,649	2,800	4,22 NS
AB	270,767	6	45,128	1,681	2,3000	3,22 NS
Error exp.	1288,80	48	26,85			
Total	2071,25	59				

Fuente:Elaboración propia

CV. 48, 20 %

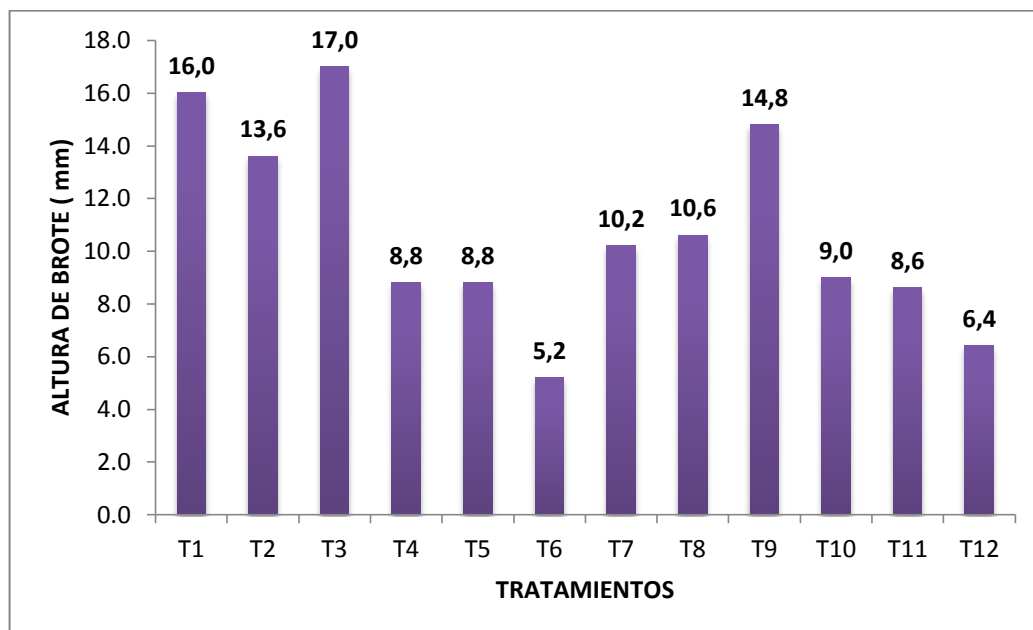


Gráfico 3 :Altura promedio de brotes por explante (mm) ,Tacna 2015

Fuente :Elaboracion Propia

El análisis de varianza (**Cuadro 5**), indica los resultados de altura de brote por explante (mm) ; (**gráfico 3**) indica el promedio de altura de brotes por explantes ; los resultados indican que existen diferencias estadísticas significativas para el factor “A” bencil aminopurina (**Cuadro 5**); lo que demuestra que al menos uno de los niveles causó efecto.

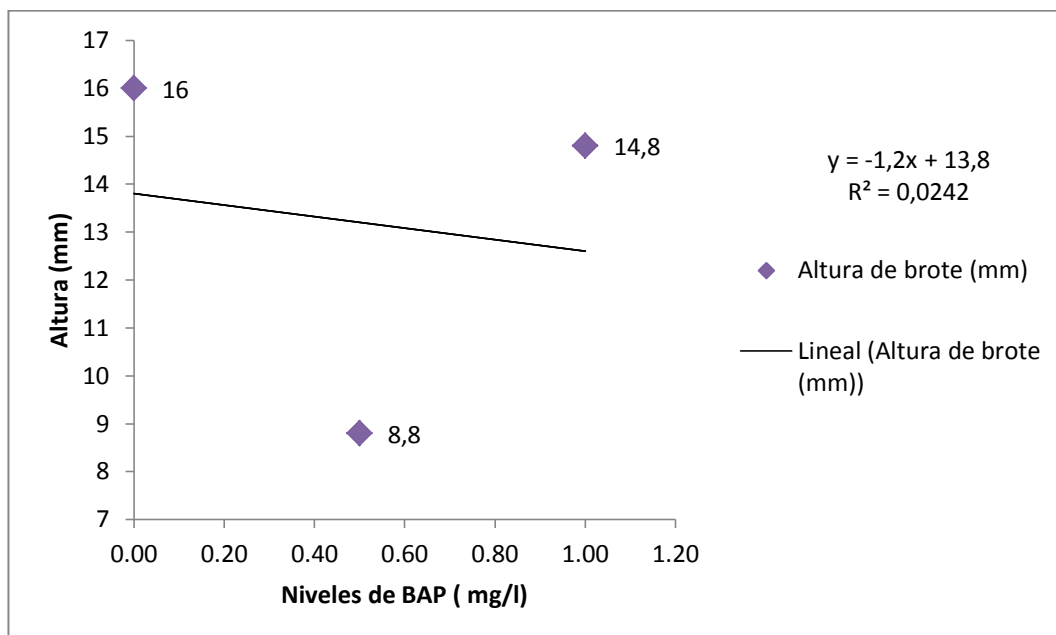


Gráfico 4 :Funcion lineal de altura de brote por explante (mm) según bencil aminopurina.Tacna ,2015

Fuente :Elaboracion Propia

El coeficiente de variación es de 48,20 % considerado elevado, se justifica porque las alturas promedio de cada unidad experimental no fueron lo suficientemente homogéneas frente a un mismo tratamiento, probablemente debido a factores internos del explante que dificultaron el proceso de adaptación al sistema in vitro y por ende dificultaron un crecimiento sobresaliente.

En el gráfico 5 , se observa una tendencia al ajuste lineal de altura de planta para niveles de BAP cuya influencia en los explantes in vitro se determinó mediante la ecuación de la función lineal:

$$Y = 13,8 - 12 (x)$$

El coeficiente de correlación : - 0,1555 lo que se refleja en una línea decreciente a medida que se incrementan los niveles hormonales.

Sin la aplicación hormonal , se alcanzó una altura en promedio de 13 , 8 mm, es decir ; a medida que se incrementan los niveles de BAP, el crecimiento de los brotes por explantes decrece., en consecuencia la recta es decreciente, lo que indica que la dependencia entre las variables es inversa.

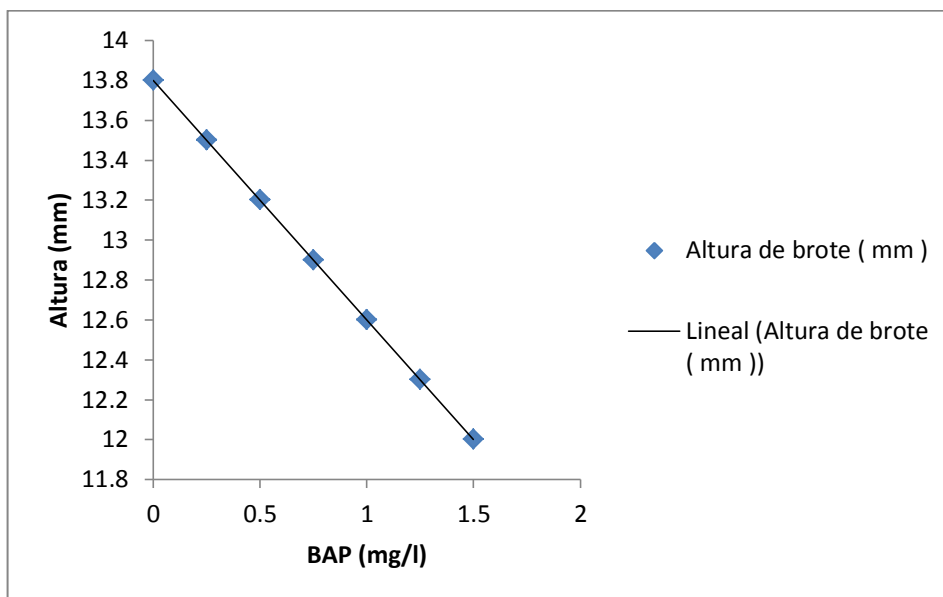


Gráfico 5 :Línea de proyección para altura de brote por explante (mm) según bencil aminopurina .Tacna ,2015

Fuente :Elaboracion Propia

El gráfico 6 , muestra claramente la línea de regresión, donde a medida que se incrementan los niveles de bencil aminopurina , la altura de brotes por explante disminuye obteniéndose la mejor respuesta, sin la aplicación de ningún nivel hormonal , el coeficiente de determinación r^2 señala que el 2,4193 % de la altura del brote esta influenciado por la dosis de bencil aminopurina , lo que indica que no existe gran implicancia de la variable independiente sobre la variable dependiente.

Los resultados obtenidos demuestran que el uso de fitohormonas no tiene un efecto significativo en respuesta a la altura de brotes por explante , lo

que indica que la formación y crecimiento del brotes se debe a niveles hormonales endógenos propios del explante y al efecto del medio de cultivo utilizado.

La acción hormonal de la auxina natural ácido indolacético estimuló la síntesis de clorofila para darle el color respectivo al brote en desarrollo.

Los resultados obtenidos mediante la investigación nos indican que tanto la citoquinina y la auxina suministrada al medio de cultivo no tuvieron un efecto estimulante en el crecimiento y desarrollo de brotes, lo cuál es demostrado mediante el análisis de varianza y regresión.

Esto demuestra que el crecimiento satisfactorio del explante no se encuentra directamente influenciado por la acción hormonal del bencil aminopurina.

Leal (2003), obtuvo resultados de propagación in vitro en (*Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey) , utilizando discos foliares en el medio Nitsch , sin reguladores de crecimiento ,estos resultados se asemejan a los obtenidos en la presente investigación .

5.4 Número de brotes por explantes introducidos de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey).

La evaluación de número de brotes por explantes de (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) se realizó a los 40 días de la introducción al sistema in vitro

Cuadro 6: Análisis de varianza para Número de brotes por explantes en el establecimiento al sistema in vitro de (*Passiflora mollissima* (Kunth)L.H.Bailey) Tacna 2015.

F.V.	SC	G.L.	CM	FC	FT	
A	0,0478	2	0,024	0,47	3,190	5,08 NS
B	0,2489	3	0,083	1,62	2,800	4,22 NS
AB	0,6837	6	0,1139	2,22	2,3000	3,22 NS
Error exp.	2,46	48	0,0513			
Total	3,442	59				

Fuente: Elaboración Propia

CV.19, 92 %

Se llegaron a desarrollar 1,13 brotes por explantes en promedio bajo el sistema *in vitro* para los diferentes tratamientos fitohormonales en estudio.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza (**Cuadro 6**) nos indican que no existen diferencias significativas en los diferentes tratamientos en estudio.

Otahola *et al.*, (2010), obtuvo para el número de brotes por explantes de yemas laterales en la evaluación realizada 45 después de la introducción mostró que los tratamientos donde se utilizaron las dosis de 1,5 y 2,0 mg/l de BAP en parchita (Tumbo) se obtuvieron un mayor número de brotes por explantes. Sin embargo el autor señala que los brotes obtenidos al utilizar estos niveles son de menor tamaño, lo cual en algunos casos dificulta su crecimiento y separación posterior, estos resultados se diferencian a los obtenidos en la presente investigación ya que en los cuales no existió presencia de un número elevado de brotes por explantes, pero sí brotes de deseables características y adecuado.

CONCLUSIONES

1. Se llegó a determinar que sin el uso de niveles hormonales de 6 – bencil amino purina , se obtuvieron satisfactorios resultados en el establecimiento in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunh) *L.H.Bailey*).
2. Se llegó a determinar que sin el uso de niveles hormonales de ácido indol acético ,se obtuvieron satisfactorios resultados en el establecimiento in vitro de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* (Kunh) *L.H.Bailey*).

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda hacer ensayos con diferentes niveles de Kinetina (Kin) , para ver un mejor efecto en adaptación al sistema in vitro.
2. Hacer variaciones en la composición nutricional del medio de cultivo Nitsch & Nitsch, el cual por sus características y los resultados obtenidos en este ensayo representa una gran alternativa como medio de cultivo base.
3. Con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación en (*Passiflora mollissima* H.B. Kunth) se recomienda realizar futuras investigaciones relacionadas a micropropagación in vitro y aclimatación a condiciones medio ambientales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azofeifa, Á.(2009), Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados invitro,Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal,vol. 20, núm. 1, enero-julio, 2009, pp. 153-175.

Becerra Vargas, D. (2003), Efecto del origen de materia y la edad sobre la capacidad morfogenética de dos especies de *Passiflora* (*Passiflora mollissima* L.,*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) cultivadas in vitro, Universidad Javeriana ,Colombia .

Beinites, A., (2005) . Avances recientes en Biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas . Barcelona ; Reverte .España .

Copaja, G.,(2004).Características agrobotánicas del cultivo del tumbo (*Passiflora mollissima* L.) En la Región Tacna .Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Cancino, G. O., Darvey, M. R., Lowe, K. C., Power, J. B. (1998). Shoot regeneration from leaf and shoot explants of *Passifloramollissima*. Journal of Experimental Botany 49 (Suppl.), 65 (Abstract)

Cronquist, A. (1978), The Evolution and Classification of Flowering Plants.

Allen Press. New York Botanical Garden. USA. 396 p.

Calzada B. (1993). Frutales nativos .Ediciones Universidad Nacional

Agraria la Molina Lima – Perú.P 366

Caicedo, G., (1997). La Curuba de Castilla, un Frutal Andino. *Passiflora*

mollissima (H.B.K.) Bailey. Notas Divulgativas. Jardín Botánico

José Celestino Mutis. Bogotá. Colombia. 21 p.

Escobar, L. A. (1992), La Sistemática y la Evolución de las *Passifloras*.

Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira.

Colombia. pp 51- 54.

Estrada . N. (2000), La Biodiversidad en el Mejoramiento Genetico de la

Papa .Centro Internacional de la Papa (CIP); Instituto

Internacional de Recursos Fitogeneticos (IPGRI) , PROINPA ,

Primera Edicion – Bolivia.

Fernández, O.; O. Ale (2005), Técnicas de propagación y mejoramiento del cultivo del tumbo (*Passiflora Mollisima, L*) en Tarata, revista Ciencia y Desarrollo, volumen 1, pag. 135 – 138.

Farfan Lopez ,C.,(1983). Cultivo de tejidos meristemáticos de tomate (*Lycopersicum esculentum*) ,crisantemo (*Crysantemo sp.*) y curuba (*Passiflora mollisima* H.B.K. Bailey) ,UPTC , Tunja ,Colombia .

Gonzales,H.,Ramos ,A. Camarillo ,I.,Silos,H.,(1999),Manual de curso: Biotecnología Vegetal (cultivo de tejidos),Primera edición, México, pag.54-55.

Heywood,V,H.(1985) , Las plantas con Flores .Edición en Español .Editorial Reverte.S.A.España pag 98-99.

Killip,E.P.,(1938),The americanSpecies of Passifloraceae.Fiel museum of Natural History.Vol 19 Part 1 and 2.Chicago USA. Pag.613

León. B.; P.Jorgensen. (2006), El libro rojo de las plantas endémicas del Perú - Passifloraceae endémicas del Perú, Revista Peruana de Biología, Vol. 13, N° 2, : pag.487s - 491s.

Lira Saldivar, R. (1994), Fisiología vegetal, Primera edición, México.

Leal Gutierrez, C.,(2003). Organogenesis in vitro a partir de discos de hojas de *Passiflora mollissima* H.B.K.Bailey(curuba) infectados con *agrobacterium tumefaciens* . Pontificia Universidad Javariana – Colombia .

Levitus ,G.,et al.,(2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II .INTA , Segunda edición .Argentina .

Ministerio de Agricultura y Riego, (2013), Líneas de cultivos emergentes (*Passiflora mollissima* L.)

Monasterio L.-Mejia C.(1993) Taxonomía de Fanerogamas Peruanas CONCYTEC.Trujillo – Peru .P602.

Mosquera Quijano, C., et al.,(1993). Micropropagacion de nudos de curuba (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) revista de ciencias agrícolas ,Vol.12 ,Núm.2 ,pag.20.

Perea Dallos, M. (2010) ,Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutos tropicales .revista agronómica .

Rojas Garcidueñas, M.(1979), Fisiología vegetal Aplicada, Segunda edición, **Limusa : Grupo Noriega Editores,** México.

Rojas Garcidueñas, M. (1993), Control hormonal del desarrollo de las plantas , Segunda edición, Limusa : Grupo Noriega Editores México.

Roca, W., Mroginski, L. (eds.). (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. 970 pag.

Rivera, R., Perea Dallos, M. (2001). Morfogénesis in vitro de *Passifloras*. En: Perea Dallos, M. (ed.). En: Biotecnología agrícola: un enfoque hacia el mejoramiento de plantas. Ministerio de Agricultura y

Desarrollo Rural. Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola (Asohofrucol). Universidad Nacional de Colombia, Asociación Nacional de Estudios Vegetales in vitro (ACEVIV), 177-183.

Universidad Politecnica de Valencia ,(2010). Regulacion del crecimiento y desarrollo : Las hormonas vegetales o Fitorreguladores , Escuela Tecnica Superior de Ingenieria Agronomica y del medio Natural .

Zegarra, R.,(2008).BotanicaAgricola y Taxonomia de las Plantas Cultivadas del Peru.,Primera Edicion ,Tacna .

ANEXO 1

Composición del medio de cultivo modificado

Constituyentes	Concentración (mg/l)
Medio de Cultivo Nitsch & Nitsch	
Macro elementos	
NH ₄ NO ₃	720
KNO ₃	950
CaCl ₂ .2H ₂ O	220
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	68
Hierro	
Na ₂ EDTA	37,300
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800
Medio de Cultivo Murashige & Skoog	
Micro elementos	
H ₃ BO ₃	6,200
MNSO ₄ .H ₂ O	16,8
ZnSO ₄ .H ₂ O	8,6
KI	0,84
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 2

Componentes orgánicos del medio de cultivo modificado

Componentes Orgánicos	Concentración
Vitaminas	
Acido nicotínico	0,5 mg/l
Piridoxina HCL-	0,5 mg/l
Glicina	2,0 mg/l
Tiamina HCL-	0,1 mg/l
Myo-inositol	100,0 mg/l
Phytigel	2,5 gr/l
Carbón activado	8,0 gr/l
Sacarosa	20,0 gr/l

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 3

Equipos y Materiales

- **Equipos:**

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Destilador
- Microondas
- Agitador magnético
- Estufa
- Balanza analítica
- Medido de pH
- Conductímetro
-

- **Material de vidrio:**

- Tubos de ensayo de 18 mm, de diámetro
- Probetas de 1000 ml, 500 ml, 50ml, 10ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml, 1ml.
- Placas Petri

- Matraces de 500 ml ,100 ml y 50 ml.
- Vaso de precipitados de 500 ml
- Bagueta
- Embudo de vidrio
- Mechero

▪ **Instrumental**

- Pinzas
- Mango de Bisturí N°3
- Hoja de Bisturí N°10 ,12 y N° 22
- Papel de aluminio
- Algodón
- Parafilm
- Guantes
- Mascarillas

ANEXO 4

Altura de brote de explante para el establecimiento in vitro de *Passiflora mollissima* a los 40 días (mm)

T1 a1b1	T2 a1b2	T3 a1b3	T4 a1b4	T5 a2b1	T6 a2b2
20	10	13	17	16	4
16	11	12	10	16	3
23	15	17	5	3	3
18	22	20	7	6	10
3	10	23	5	3	6
16	13,6	17	8,8	8,8	5,2

T 7 a2b3	T8 a2b4	T9 a3b1	T10 a3b2	T11 a3b3	T12 a3b4
15	15	12	9	10	8
11	10	14	10	10	8
10	10	13	8	8	3
8	10	32	10	7	8
7	8	3	8	8	5
10,2	10,6	14,8	9	8,6	6,4

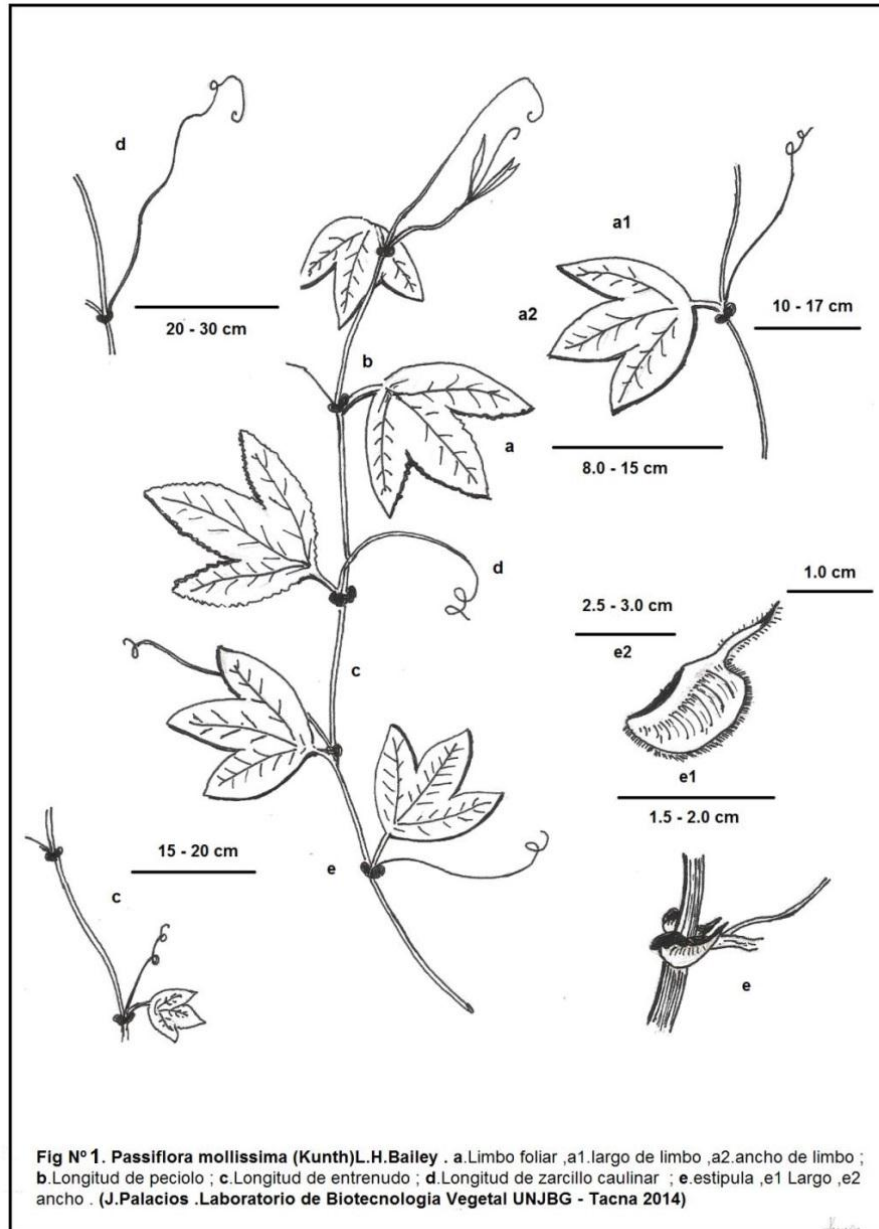
ANEXO 5

Número de brote de explante para el establecimiento in vitro de *Passiflora mollissima* a los 40 días

T1 a1b1	T2 a1b2	T3 a1b3	T4 a1b4	T5 a2b1	T6 a2b2
1	2	1	1	1	2
1	3	1	1	2	1
1	1	1	1	2	1
1	1	1	3	1	1
1	2	1	1	1	3
1	1,8	1	1,4	1,4	1,6

T 7 a2b3	T8 a2b4	T9 a3b1	T10 a3b2	T11 a3b3	T12 a3b4
2	2	3	1	1	1
1	3	2	1	1	1
1	1	2	1	1	2
1	1	2	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1,2	1,6	2	1	1	1,2

ANEXO 6



ANEXO 7



Figura 2. Plantas madre de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey .Tacna 2015



Figura 3. Introducción al sistema in vitro de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey .Tacna 2015



Figura 4. Explantes introducidos de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey en el cuarto de cultivo .Tacna 2015



Figura 5. Explante de mollissima (Kunth) L.H. Bailey, en medio de cultivo modificado y suplementado con BAP 0,0 mg/L .Tacna 2015